

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification <sup>6</sup> :</b>  <b>A61K 38/00</b>	<b>A2</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 98/33509</b>  <b>(43) International Publication Date:</b> 6 August 1998 (06.08.98)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/IB98/00441  <b>(22) International Filing Date:</b> 2 February 1998 (02.02.98)  <b>(30) Priority Data:</b> 60/036,859      3 February 1997 (03.02.97)      US 09/017,043      2 February 1998 (02.02.98)      US  <b>(63) Related by Continuation (CON) or Continuation-in-Part (CIP) to Earlier Application</b> US      Not furnished (CON) Filed on      2 February 1998 (02.02.98)  <b>(71) Applicant (for all designated States except US):</b> PHARMING B.V. [NL/NL]; Niels Bohrweg 11-13, NL-2333 CA Leiden (NL).  <b>(72) Inventors; and</b> <b>(75) Inventors/Applicants (for US only):</b> NUIJENS, Jan [NL/NL]; Zevenhuizerlaan 42, NL-1851 MV Heiloo (NL). VAN BERKEL, Patrick, H., C. [NL/NL]; Rodenrijserweg 315, NL-2651 BS Berkel en Rodenrijs (NL).		<b>(74) Agent:</b> BIZLEY, Richard, Edward; Hepworth Lawrence Bryer & Bizley, Merlin House, Falconry Court, Baker's Lane, Epping, Essex CM16 5DQ (GB).  <b>(81) Designated States:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Published</b> <i>Without international search report and to be republished upon receipt of that report.</i>
<b>(54) Title:</b> USEFUL PROPERTIES OF HUMAN LACTOFERRIN AND VARIANTS THEREOF  <b>(57) Abstract</b>  The invention provides compositions containing human lactoferrin, or lactoferrin variants deleted for one or more arginine residues in the amino-terminal region of the protein (i.e., in the first basic cluster), and methods of using the compositions. The human lactoferrin, or lactoferrin variants, are useful for treatment of human diseases and conditions, including inflammation.		

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-515893

(P2002-515893A)

(43) 公表日 平成14年5月28日 (2002.5.28)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	キーワード (参考)
A 6 1 K 38/16		A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 7/00		7/06	
7/06		9/10	
9/10		29/00	
29/00		31/12	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 79 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平10-532679	(71) 出願人	ファーミング インテレクチュアル プロ パティ ビービー
(86) (22) 出願日	平成10年2月2日 (1998.2.2)		オランダ国 エヌエル-2333 シーエイ ライデン, ニールズ ボーウェグ 11-13
(85) 翻訳文提出日	平成11年8月3日 (1999.8.3)	(72) 発明者	ニュージェンズ, ジャン
(86) 国際出願番号	P C T / I B 9 8 / 0 0 4 4 1		オランダ国 エヌエル-1851 エムブイ ハイロー, セベンフイザーラール 42
(87) 国際公開番号	W O 9 8 / 3 3 5 0 9	(72) 発明者	バン パーケル, バトリック エイチ. シ ー,
(87) 国際公開日	平成10年8月6日 (1998.8.6)		オランダ国 エヌエル-2651 ビーエス パーケル エン ロデンリス, ロデンリザ ーウェグ 315
(31) 優先権主張番号	6 0 / 0 3 6 , 8 5 9	(74) 代理人	弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成9年2月3日 (1997.2.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		
(31) 優先権主張番号	0 9 / 0 1 7 , 0 4 3		
(32) 優先日	平成10年2月2日 (1998.2.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトラクトフェリンおよびその改変体の有用な特性

## (57) 【要約】

本発明は、ヒトラクトフェリン、またはタンパク質のアミノ末端領域で（すなわち、第1の塩基性クラスターで）1つ以上のアルギニン残基を欠くラクトフェリン改変体を含む組成物、およびこの組成物を使用する方法を提供する。ヒトラクトフェリンまたはラクトフェリン改変体は、炎症を含む、ヒトの疾患および症状の処置に有用である。

14. ヒトラクトフェリンを含む組成物を患者に投与する工程を包含する、患者においてTNF $\alpha$ 媒介好中球脱顆粒を減少させる方法。

15. ヒトラクトフェリンを含む前記組成物が、請求項1に記載の組成物である、請求項14に記載の方法。

16. 患者においてラクトフェリンレセプター保有細胞に鉄を送達する方法であって、ヒトラクトフェリンを含む組成物を該患者に投与する工程を包含し、ここで、該ヒトラクトフェリンが、鉄で少なくとも約95%飽和される、方法。

17. ヒトラクトフェリンを含む前記組成物が、請求項1に記載の組成物である、請求項16に記載の方法。

18. ヒトラクトフェリンを含む組成物を患者に投与する工程を包含する、患者において慢性炎症性腸疾患を処置する方法。

19. ヒトラクトフェリンを含む前記組成物が、請求項1に記載の組成物である、請求項18に記載の方法。

20. ヒトラクトフェリンを含む組成物を患者に投与する工程を包含する、患者において貧血または鉄蓄積疾患を処置する方法。

21. ヒトラクトフェリンを含む前記組成物が、請求項1に記載の組成物である、請求項20に記載の方法。

22. ヒトラクトフェリンを含む組成物を患者に投与する工程を包含する、患者において炎症を減少させる方法。

23. ヒトラクトフェリンを含む前記組成物が、請求項1に記載の組成物である、請求項22に記載の方法。

24. ヒトラクトフェリンを含む組成物を患者に投与する工程を包含する、患者において固形腫瘍の増殖を阻害する方法。

25. ヒトラクトフェリンを含む前記組成物が、請求項1に記載の組成物である、請求項24に記載の方法。

26. 請求項1に記載の組成物を患者に投与する工程を包含する、患者においてナチュラルキラー（NK）細胞を刺激する方法。

27. ヒトラクトフェリンを含む前記組成物が、請求項1に記載の組成物であ

ウイルスの該細胞への侵入が阻害される、方法。

37. 前記ウイルスが、CMV、HSV1、またはHIVである、請求項36に記載の方法。

性化したリンパ球、および血小板が挙げられる。

#### 発明の簡単な要旨

本発明は、ヒトラクトフェリン、またはタンパク質のアミノ末端領域における（すなわち、第1の塩基性クラスターにおける）1つ以上のアルギニン残基を欠失したラクトフェリン改変体を含む組成物、および組成物の使用を提供する。1つの局面では、本発明は、第1の塩基性クラスターにおける1つ以上のアルギニン残基を欠失したヒトラクトフェリン改変体を含む組成物である。本発明は、特に、ヒトラクトフェリン改変体 hLF<sup>11</sup>、hLF<sup>12</sup>、hLF<sup>13</sup>、および hLF<sup>14</sup> に関する。これらの改変体のこれらの結合特性は、有利な点で、天然ラクトフェリンの特性とは異なる。1つの局面では、組成物は、必要に応じてウシ乳汁を含む、薬学的組成物である。いくつかの実施態様では、ヒトラクトフェリンまたはラクトフェリン改変体は、鉄で飽和され、代表的には少なくとも95%飽和される。

本発明はまた、ヒトラクトフェリンおよびラクトフェリンアルギニン欠失改変体の使用に関する。1つの局面では、本発明は、hLFまたはhLF改変体を投与することによって、ラクトフェリンレセプター、例えば、105kdラクトフェリンレセプターを活性化する方法を提供する。

他の局面では、本発明は、ラクトフェリンまたはラクトフェリン改変体を投与することによって、患者においてラクトフェリンレセプター保有細胞から、IL-1、IL-2、またはTNF $\alpha$ のようなサイトカインの放出を減少または阻害する方法を提供する。

他の局面では、本発明は、ヒトラクトフェリンまたはラクトフェリン改変体が、慢性炎症性腸疾患の処置のために骨髓造血を阻害するために、または患者においてTNF $\alpha$ 媒介好中球脱顆粒を減少させるために、患者に投与される方法を提供する。

他の局面では、本発明は、鉄で少なくとも約95%飽和されるヒトラクトフェリンまたはラクトフェリン改変体の組成物を患者に投与することによって、患者においてラクトフェリンレセプター保有細胞に鉄を送達する方法を提供する。これらの化合物の投与は、例えば、貧血または鉄蓄積疾患(iron storage disease)の

を、0.02% (w/v) Tween-20および種々の濃度のNaClを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.6に懸濁した。Sephroseビーズを、ヘッドオーバーヘッドローテーションによって $^{125}$ I-hLFとともにインキュベートした。16時間後、ビーズを10mMリン酸ナトリウム、0.02% Tween-20で洗浄し、そして結合した放射能を測定した。結果を、添加した $^{125}$ I-hLFの総量の結合割合として表した。Sephrose懸濁液のNaCl濃度を横軸に示す。

図3は、ヘパリン、リピドA、およびhLZに結合するhLFの抗hLF mAb E11による競合阻害を示す。プレートに、ヘパリン（左）、リピドA（中）、およびhLZ（右）でコーティングした。ビオチン化hLFを、記載のように抗hLF mAb E11(□)、抗hLF mAb E3(■)、およびコントロールmAb (●) の連続希釈とともにインキュベートした。競合物の存在で結合する残りのhLF（競合物なしでのhLFに関して；100%）を、縦軸に示す。ウェル中のmAb濃度（nM）を横軸に示す。

図4は、抗hLF mAbへの組換えN-およびC-ローブならびに天然hLFの結合を示す。天然hLF（100ng/ml、□）およびrN-ローブ（○）またはrC-ローブ（△）を分泌する293(S)細胞の馴化培地の連続希釈を、記載のようにマイクロタイタープレートにコーティングされた精製したmAb E11(A)；E3(B)およびE19(C)とともにインキュベートした。結合したhLFを、ペルオキシダーゼ結合抗hLFとの続いてのインキュベーションによって検出した。基質変換を硫酸で停止した後に測定したA<sub>492</sub>値を、縦軸に示す。試験した実験容量（μl）を、横軸に示す。

図5は、抗hLF mAb E11およびE3へのN末端欠失したおよび天然のhLFの結合の比較を示す。天然hLF（40μg/ml、■）、hLF<sup>1-11</sup>（20μg/ml、□）、hLF<sup>1-11</sup>（10μg/ml、●）、およびrhLF<sup>1-11</sup>（7μg/ml、○）の連続希釈を、SephroseにカップリングしたmAb E11(A)またはE3(B)とともにインキュベートした。結合したhLFを、ポリクローナル $^{125}$ I-抗hLF抗体との続いてのインキュベーションによって検出した。結果を、添加した抗体の総量の結合の割合として表した。

図6は、限定してタンパク質分解されたhLfのMono Sクロマトグラフィー後に得られる精製したN末端欠失したhLfの非還元SDS-PAGE分析を示す。0.5および0.6 NaClでMono Sから溶出された限定してタンパク質分解されたhLfを含む画分を、非還元サンプル緩衝液で希釈し、そして5分間煮沸した後にSDS-PAGE（12.5%

図12は、30mM塩素酸ナトリウムの存在または非存在下で培養したJurkat細胞への天然hLfおよびN末端欠失したhLf改変体の結合パラメータを示す。塩素酸ナトリウムの非存在下で培養した細胞におけるhLf(1)の、および24時間塩素酸ナトリウムの存在下で培養した細胞におけるhLf(2); hLf<sup>'</sup>(3); rhLf<sup>'</sup>(4)の、解離定数(a)および細胞当たりの結合部位の数(b)。値は、二連での2～3の別々の実験の平均(±S.E.M.)である。

図13は、塩基性残基の分布を示すhLf、bLf、およびmLfのN末端アミノ酸配列アラインメントを示す。hLf [Metz-Boutigueら, 1984, Eur. J. Biochem. 145, 659-676; Reyら, 1990, Nucleic Acids Res. 18, 5288] と、bLf [Pierceら, 1991, Eur. J. Biochem. 196, 177-184] と、mLf [Pentecostら, 1987, J. Biol. Chem. 262, 10134-10139] との間の同一アミノ酸を四角で囲む。ArgおよびLys残基に、それぞれ黒および灰色で下線を引く。配列の番号付けは、Metz-Boutigueら, 前出による。

図14は、全血培養物中の種々のラクトフェリン種によるヘパリンの中和を示す。種々の濃度でヘパリンを、100μg/mlラクトフェリンの存在または非存在下で希釈した全血に添加した。2時間後、上清中のTAT複合体の量を、ELISAによって決定した。

図15は、種々のGAGによる全血培養物の抗凝固ならびにラクトフェリンおよび硫酸プロタミンによる中和を示す。種々の濃度のヘパリン、エノキサパリン(enoxaparine)、硫酸ヘパラン、またはNアセチルヘパリンを、非存在(○)または100μg/ml hLF(■)、bLF(□)、もしくは2μg/ml硫酸プロタミン(●)の存在下で、希釈した全血に添加した。2時間後、上清中のTAT複合体の量を、ELISAによって決定した。

図16は、HT-29細胞への天然hLFの特異的結合を示す。値は、二連の実験の平均である。挿入図は、データのスキッチャード分析を示す。

図17は、HT-29細胞への天然hLFの特異的高親和性結合を示す。値は、二連の実験の平均である。挿入図は、データのスキッチャード分析を示す。

図18は、HT-29細胞へのhLFの結合の阻害を示す。ヒトラクトフェリンを、mAbE



例えば、実質的にMetz-Boutigueら, 1984, Eur. J. Biochem. 659:1451に記載の  
ようなアミノ酸配列を有するポリペプチドをいい、PCT公開W091/08216および他

の刊行されたタンパク質およびDNA配列で同定された配列不一致を示す。用語天然ラクトフェリンはまた、第1の塩基性クラスター（すなわち、アミノ末端残基2～5）における欠失および／または第2の塩基性クラスター（すなわち、残基25～31）における欠失のある任意の改変体が、天然ラクトフェリンではないこと以外は、天然に存在するヒトラクトフェリンと比較して、1つ以上のアミノ酸の挿入、置換、または欠失によって改変されている天然に存在するヒト対立遺伝子変異体およびアミノ酸配列改変体を含む。

天然ラクトフェリンは、ウシのようなトランスジェニック非ヒト動物で発現される組換えコードされたヒトラクトフェリン(「rhLF」)を含み、ここで、グリコシル化パターンは、ヒト乳汁から得られる天然に存在するヒトラクトフェリンのグリコシル化パターンとは異なり得る。

#### ラクトフェリン改変体

本明細書に記載のラクトフェリン改変体は、アミノ末端での1、2、3、または4アルギニン残基が除去されている（すなわち、第1の塩基性クラスターのすべてまたは一部の欠失）か、または第2の塩基性クラスターの残基が除去されているか、または第1および第2の両方の塩基性クラスターが除去されている、天然ラクトフェリンの配列を有するポリペプチドを含む。第1の塩基性クラスターのアルギニン残基は、天然ラクトフェリンのタンパク質分解によって、または短縮型hLFをコードするポリペプチドの発現によって、除去され得る。あるいは、第1の塩基性クラスターの1つ以上のアルギニン残基は、他の（すなわち、アルギニン以外）アミノ酸によって、例えば、hLFをコードするポリヌクレオチドの特異的(directed)変異誘発によって、置換され得る。好ましい実施態様では、第1の塩基性クラスターの1つ以上のアルギニン残基は、欠失されるか、あるいは、生理学的pHで正荷電していないアミノ酸、すなわち、中性または酸性残基に、通常は中性アミノ酸に、より頻繁にはアラニン、ロイシン、グリシン、バリン、またはイソロイシンに変異される。以下、第1の塩基性クラスターのすべてまた



実質的に含まない

LF改変体組成物は、サンプルに存在するヒトタンパク質の少なくとも約90%、

より通常には少なくとも約95%、および最も普通には少なくとも約99%が、LF改変体である場合、他のヒトタンパク質（天然hLFを含む）を実質的に含まない。

サンプルに存在する任意の特異的タンパク質の量は、（比較的単純な混合物については）定量的SDS-PAGEによって、またはより複雑な混合物（例えば、ウシ乳汁タンパク質とLF改変体との混合物）については免疫学的アッセイ（例えば、ELISAおよびRIA）によって、決定され得る。

免疫学的および分子生物学的方法は周知であり、そして、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989ならびにHarlowおよびLane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring harbor, New York(1988)に記載され、その両方とも、その全体がおよびすべての目的で参考として本明細書に援用される。

実質的に純粋

本明細書で使用される場合、「実質的に純粋」とは、目的の種が存在する優性な種である（すなわち、モルベースでは、組成物中の任意の他の個々の種よりも豊富である）ことを意味し、そして好ましくは、実質的に精製された画分は、目的の種が、存在するすべての巨大分子種の少なくとも約50パーセント（モルベースで）を含む組成物である。一般的に、実質的に純粋な組成物は、組成物に存在するすべての巨大分子種の約80～90パーセントより多くを含む。最も好ましくは、目的の種は、本質的に均一（夾雑種は、従来の検出方法によって組成物中で検出され得ない）まで精製され、ここで組成物は、単一の巨大分子種から本質的になる。

### III. ラクトフェリンおよびラクトフェリン改変体の産生

1つ以上のアミノ末端アルギニン残基を欠くLF改変体は、種々の方法によって産生され得る。産生の好ましい方法には、(1)天然LFのタンパク質分解切断、または(2)組換え発現、例えば、LF遺伝子の変異誘発、次いでLF改変体の細胞また

から分離される。陽イオン交換樹脂に結合したラクトフェリンは、水性、代表

的には緩衝化された、NaClまたはKCl勾配（例えば、20mMリン酸ナトリウム、pH7.5中0～1M NaClの直線勾配）で、あるいは0.4M以上、好ましくは少なくとも0.5M NaClまたはKClの水性、好ましくは緩衝化された、NaClまたはKCl溶液で、バッチ溶出または段階的溶出によって、溶出される。適切な溶出条件を選択することによって、ヒトラクトフェリンは、ウシ乳汁から実質的に精製され、そして効率的方法によってウシラクトフェリンから実質的に分離される。

ヒトラクトフェリン（例えば、rhLF）は、塩勾配または段階的溶出で、S Sepharose<sup>®</sup> Fast Flowのような強陽イオン交換体での再クロマトグラフィーのさらに続いての工程によって内因性ラクトフェリン（例えば、bLF）からさらに精製され得、内因性非ヒトラクトフェリン種（例えば、bLF）の軌跡を維持することから、ヒトラクトフェリンを分離するか、および／またはbLFは、hLFよりもConA樹脂により強力に結合しているので、bLFからヒトラクトフェリンをさらに分離するためにコンカナバリンA樹脂でのアフィニティークロマトグラフィーを必要に応じて含み得る。

精製された天然ラクトフェリンのトリプシン切断は、以下のように行われ得る：5ミリグラムの天然hLFを、PBS中37℃にて1:8の酵素：基質モル比でトリプシンとインキュベートする。切断を、12倍モル過剰のSBTIの添加によって1、5、25分、および3時間後に停止し、そしてN末端完全性を、例えば、分析用Mono Sクロマトグラフィー（Van Berkelら、1995、Biochem. J. 312:107-114）ならびにSDS-PAGE、クロマトグラフィー、およびタンパク質配列決定のような標準的技法によって、モニターする。

タンパク質分解の後、LF改変体は、互いからおよび天然の（すなわち、切断されていない）hLF（および、存在するならば他のタンパク質）から、陽イオン交換クロマトグラフィー（例えば、Mono S；ヘパリン）、疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）、またはCibacron Blue Sepharoseクロマトグラフィーによって分離され得る。1つの実施態様では、LF改変体は、組換え発現されたラクトフェリンまたはラクトフェリン改変体およびS Sepharoseの4時間のバッチ式イン

込まれる。しばしば、本発明の核酸は、適切な組換え宿主細胞を産生するために使用され得る。詳細には、DNA構築物は、細菌（例えば、*E. coli*）のような原核生物宿主における複製に適切であるか、または培養された哺乳動物、植物、昆虫

（例えば、Sf9）、酵母、菌類、もしくは他の真核生物細胞株に導入され得る。

特定の宿主、例えば、昆虫または細菌への導入について調製されるDNA構築物は、代表的には、宿主によって認識される複製系、所望のポリペプチドをコードする目的のDNAセグメント、ならびにポリペプチドコードセグメントに作動可能に連結される転写および翻訳開始ならびに終結調節配列を含む。DNAセグメントは、別のDNAセグメントとの機能的関係に配置される場合、作動可能に連結される。例えば、プロモーターまたはエンハンサーは、配列の転写を刺激するならば、コード配列に作動可能に連結される。シグナル配列についてのDNAは、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現されるならば、ポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結される。一般的に、作動可能に連結されるDNA配列は隣接し、そしてシグナル配列の場合、両方とも隣接しそしてリーディングフレーム内である。しかし、エンハンサーは、これが転写を制御するコード配列に隣接する必要がない。連結（linking）は、便利な制限部位で、またはその代わりに挿入されるアダプターもしくはリンカーで、連結（ligation）によって達成される。適切なプロモーター配列の選択は、一般的に、DNAセグメントの発現について選択される宿主細胞に依存する。適切なプロモーター配列の例には、当該技術分野で周知の原核生物および真核生物プロモーターが挙げられる。例えば、Sambrookら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第2版), 第1～3巻 Cold Spring Harbor Laboratory (1989) を参照のこと。転写調節配列には、代表的には、宿主によって認識される異種エンハンサーまたはプロモーターが挙げられる。適切なプロモーターの選択は宿主に依存するが、*trp*、*lac*、およびファージプロモーターのようなプロモーター、*tRNA*プロモーター、ならびに解糖系酵素プロモーターが公知であり、そして利用可能である。Sambrookら (1989) を参照のこと。

ポリペプチドコードセグメントについての挿入部位とともに複製系ならびに転写および翻訳調節配列を含む便利に利用可能な発現ベクターが用いられ得る。細

フェリンレセプター、LPS、ヒトリソチーム、および結合が第1のクラスター依存性である他の分子へのラクトフェリンの結合を阻害する。

第1の塩基性クラスターを中和するための好ましい方法は、アミノ末端で結合しそして第1の塩基性クラスターと標的分子（例えば、ヘパリン）との間の結合

を抑制するモノクローナル抗体とhLFをインキュベートすることである。モノクローナル抗体を産生するための方法は周知である（例えば、Godingら, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (第2版) Acad. Press, N.Y., ならびにHarlowおよびLane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988を参照のこと）。ヒトまたはヒト化モノクローナル抗体の使用は、これが患者への投与後の抗原応答の可能性を減少させるので、最も好ましい（例えば、米国特許第5,569,825号および第5,585,089号を参照のこと）。モノクローナル抗体の抗原結合フラグメント（例えば、Fab、Fab'F(ab')<sub>2</sub>、Fab<sub>2</sub>、およびFvフラグメント）は、同様に有用である。抗体または抗体フラグメントもまた、第2の塩基性クラスターに結合しそして第2のクラスター依存性結合を抑制するために使用され得ることが認識される。

#### IV. ラクトフェリンおよびラクトフェリン改変体の特性

A. ヘパリン、リピドA、DNA、およびヒトリソチームへの結合。

天然hLFは、ヘパリン、リピドA、DNA、およびヒトリソチーム（hLZ）に結合する。本発明の1つの発見は、第1の塩基性クラスターの1、2、または3つのアルギニンを欠くLF改変体が、これらの4つのリガンドの各々への反応性の強力な減少を示し、そして4つすべてのアミノ末端アルギニン残基が欠失される場合、結合が、標準的アッセイ（例えば、固相リガンド結合アッセイ）で検出不可能であることである。

天然LFおよびLF改変体の結合特性は、標準的結合アッセイ（以下の項5.3.2を参照のこと）で測定され得、そしてリガンドへの天然LFの結合のレベルが100%反応性として定義される場合の反応性の用語によって表され得る。LF改変体の、天然LFリガンドヘパリン、DNA、リピドA、およびhLZとの反応性は、代表的には、80%未満、より通常には60%未満、しばしば15%未満である。いくつかのLF改

、部分的に、低親和性部位への結合が、塩基性アルギニン残基の第1のクラスターによって媒介され、そして1つ以上のこれらの残基の欠失（または中和）が、低親和性部位への結合を減少または除去するという発見に基づく。したがって、本

発明のhLF改変体は、代表的には、少なくとも約10nM、通常は約10nMと約40nMとの間の親和性で高親和性LFレセプターを結合する。細胞結合アッセイは周知であり、そして例えば、Mazurier, 1989, Eur. J. Biochem. 179:481-87、ならびに以下の実施例IIに記載される。逆に、1つ以上のアミノ末端アルギニン残基の欠失は、高親和性LFレセプターへの結合を減少または消滅しない。

高親和性LF結合部位は、活性化されたリンパ球、乳腺上皮細胞、血小板、単球、マクロファージ、腸細胞、および肝細胞で見い出されており、そして同様に他の細胞タイプに存在すると考えられる。105kD特異的hLFレセプターは、活性化されたリンパ球（Mazurierら, 1989, Eur. J. Biochem. 179, 481-487）、Jurkat T細胞株（Biら, 1994, Eur. J. Cell Biol. 65, 164-171; Biら, 1996, Eur. J. Cell Biol. 69, 288-296）、および血小板（Leveugleら, 1993, Eur. J. Biochem., 213, 1205-1211）において特徴づけられている。

105kDレセプターへのLFの結合は、血小板凝集を阻害することが示されており、そしておそらくhLFの増殖因子および/または分化活性に関与する。このレセプターは、被覆小窩小胞ならびに細胞内小胞において細胞表面へ、ヒトリンパ芽球腫T細胞（すなわち、Jurkat細胞、Pawelecら, 1982, Eur. J. Immuno. 12:387-92）において局在化されている。Jurkat細胞によるhLFのインターナリゼーションが実証されている。Jurkat細胞は、12301 Parklawn Dr., Rockville, Maryland, USA 20852に位置するAmerican Tissue Type Collectionアメリカンタイプカルチャーコレクション[ATCC]から得られ得る。LFは、約40nMのkDを有するリンパ球（Jurkat細胞）高親和性レセプターに結合する。

105kDレセプターは、免疫学的方法によって同定され得る。例えば、特異的ウサギ抗105kDレセプターポリクローナル抗体が記載されている。これは、すなわち類似のポリクローナル抗体、または抗105kDレセプターモノクローナル抗体は

生物学的活性は、Nuijensら, 1996, J. Mammary Gland Biology and Neoplasia 1:3, 283-293に記載され、これは、その全体および目的について参考として本明細書に援用される。

本発明のヒトラクトフェリン改変体、および中和されたラクトフェリンは、一般的に、第1の塩基性クラスターのアルギニンの欠失が、以下の実施例に記載のように、ヘパリン、リビドA、DNA、リゾチーム、および細胞表面硫酸化分子への結合の減少を生じること以外は、天然ラクトフェリンと同じ活性および使用を有する。したがって、本発明のLF改変体は、LF投与の他の生理学的結果（例えば、結合によるヘパリンの中和）を引き起こすことなく、特定のLF媒介生理学的変化（例えば、サイトカインの調節）をもたらすために患者に投与され得る。本発明の中和されたhLFおよびhLF改変体は、種々の有利な特性を有する。例えば、第1の塩基性クラスターを欠くhLF改変体は、hLF-レセプター媒介免疫および炎症応答（例えば、減少するサイトカイン放出、ナチュラルキラー細胞の活性化、および抗腫瘍効果）、栄養性鉄の効率的レセプター媒介送達、ならびに他の生物学的効果を開始するために特に有用である。

hLFおよびLF改変体の治療効能には、局所感染、大規模（細菌）感染、血液由来感染（敗血症）を含む感染、ならびに感染または非感染炎症性疾患から生じる炎症（例えば、回腸または結腸の慢性炎症性疾患）の治療または予防での使用が挙げられる。ヒトLFおよびLF改変体はまた、感染の効果に対して器官移植レシビエントまたは他の免疫抑制された個体（例えば、AIDS患者）を調製または処置するために使用され得る。

ヒトLF、LF改変体、および中和されたhLFはまた、ラクトフェリンまたはラクトフェリン改変体を投与することによって、患者においてラクトフェリン-レセプター保有細胞からの、IL-1、IL-2、またはTNF $\alpha$ のようなサイトカインの放出を減少または阻害するために有用である。ラクトフェリンは、細胞からのサイトカイン（例えば、IL-1、IL-2、およびTNF $\alpha$ ）の放出を減少させ、そして混合されたリンパ球培養物における増殖を阻害することが示されている（Chiericiら, 1994, Acta Pediatr Suppl 402:83-89）。hLFおよび改変体によるLPSに応答する



よって、患者において刺激され得る。ヒトLFおよび改変体はまた、固形腫瘍の増殖を阻害するために患者に投与され得る。LFの単回腹腔内注射は、マウスにおいて同系線維芽細胞由来腫瘍細胞株の皮下注射によって誘導される固形腫瘍の増殖を阻害した (Bezaultら, 前出)。したがって、LF改変体は、ヘパリンの中和または他の望ましくない効果のないNK細胞の刺激に有用である。

本発明はまた、hLFまたは改変体を患者に投与する工程を包含する、ウイルス、例えば、CMV (サイトメガロウイルス) ウイルス、HIV (ヒト免疫不全ウイルス) ウイルス、またはHSV1 (単純ヘルペス1型ウイルス) ウイルスの細胞への侵入を

阻害するための方法を提供する。抗ウイルス作用は、(i)細胞侵入のためのウイルス粒子によって用いられる細胞表面プロテオグリカン (例えば、ヘパリン) とhLFとの相互作用、および(ii)hLFおよびLF改変体によるNK細胞の刺激によって、媒介される。

他の局面では、本発明は、鉄で少なくとも約95%飽和されたヒトラクトフェリンまたはラクトフェリン改変体の組成物を患者に投与する工程によって、患者におけるラクトフェリン-レセプター保有細胞に鉄を送達する方法を提供する。これらの化合物の投与は、例えば、貧血または鉄蓄積疾患の処置に有益である。LF結合した鉄またはLF改変体結合した鉄は、ポリペプチド-鉄複合体が細胞レセプターに結合しそして細胞によってインターナリゼーションされる場合、細胞に送達される。したがって、本明細書に開示される組成物は、乳児処方 (baby formula) における使用ならびに鉄代謝における障害のある患者への投与に適切である (例えば、鉄欠乏性貧血および鉄蓄積疾患、ならびに未熟児の鉄不足貧血)。LF改変体は、van Berkelら, 1995, Biochem J. 312, 107-114に記載される手順に従って、鉄で飽和され得る。本発明のラクトフェリン改変体組成物は、代表的には、鉄で少なくとも3%飽和、より通常は80%飽和、最も頻繁には少なくとも95%飽和、および頻繁には99%以上飽和される。第1の塩基性クラスター、または第1および第2の塩基性クラスターの両方を欠くLF改変体が、LFの鉄結合活性が所望される場合、および塩基性クラスター1および2によって媒介される活性 (例



。薬学的組成物中のポリペプチドの濃度は、広く、すなわち、約0.1重量%以下から、通常少なくとも約1重量%から、20重量%以上までも、変化し得る。

経口投与について、ヒトラクトフェリンまたは改変体は、カプセル剤、錠剤、および粉剤のような固体投与形態で、またはエリキシル剤、シロップ剤、および懸濁剤のような液体投与形態で投与され得る。本発明の薬学的組成物は、食品、代表的には乳汁、例えば、牛乳とともに投与され得る。投与のこの態様は、ラクトフェリン/改変体が、トランスジェニックウシ、ヤギ、またはウサギのようなトランスジェニック動物での発現によって産生される場合、利点を有する。トランスジェニックウシ乳汁におけるラクトフェリンの産生は、ヒト消費のために精製がほとんどまたは全く必要でないマトリクスを提供するので、所望される。

静脈内注入のための代表的組成物は、100～500mlの滅菌リンゲル溶液および100～500mgの組換えポリペプチドを含むように作製され得る。筋肉内注射のための代表的薬学的組成物は、例えば、1mlの滅菌緩衝化水および1～100 $\mu$ gのラクトフェリンポリペプチドを含むように作製される。非経口投与可能組成物を調製するための方法は、当該技術分野で周知であり、そして例えば、Remington's Pharmaceutical Science (15版, Mack Publishing, Easton, PA, 1980) (その全体がすべての目的のために参考として援用される) を含む、種々の出典により詳細に記載される。

化合物を含む組成物は、予防および/または治療的処置のために投与され得る。治療適用では、組成物は、疾患に既にかかっている患者に、疾患およびその合併症の徴候を治癒または少なくとも一部を緩和するために十分な量で、上記のように投与される。これを達成するために適切な量は、「治療有効量または用量」と定義される。このような有効投与量は、疾患または症状の性質および重篤度により、および患者の健康の一般的状態に依存するが、一般的に、体重1キログラム当たり約1～500mgの精製したタンパク質の範囲であり、1キログラム当たり約5～100mgの投与量が、より普通に用いられる。

予防適用では、本発明の化合物を含む組成物は、特定の疾患の疑いのあるまたはそうでなければ危険性のある患者に投与される、このような量は、「予防有効

然hLFを、25倍モル過剰のビオチンとの20℃での2時間のインキュベーションによってビオチン化した。非結合ビオチンを、10mMリン酸ナトリウム、0.15M NaCl、pH7.4 (PBS) に対する16時間の透析によって除去した。ビオチン化hLFを、0.02%アジ化ナトリウムを含むPBS中で4℃にて保存した。

#### C. 抗hLFモノクローナル抗体の産生および精製

Balb/Cマウスを、既述のように[7]50μg天然hLFでの反復腹腔内注射によって過剰免疫した。4回目の注射の4日後、脾臓細胞を、SP2/0-Ag14[ATCC CRL 1583]ミエローマ細胞と融合した。融合およびハイブリドーマ選択を、記載のように[8]行った。培養上清を、最初にラジオイムノアッセイ (RIA) によって特異的抗体の存在についてスクリーニングし、ここでは<sup>125</sup>I-hLFを抗原として使用した。hLF特異的抗体を産生するハイブリドーマを、反復限界希釈によってクローニングした。総計で、10の異なる抗hLFモノクローナル抗体 (mAb) を得た。培養上清の免疫グロブリン富化画分を、硫酸アンモニウム沈殿によって調製し、そしてSepharose (1gのCNBr活性化Sepharose 4Bに対して20mgのタンパク質) にカップリングしたか、または製造業者の推奨のようにRepligen抗体精製キット (Cambridge, MA, USA) での抗hLF mAbの精製のために使用した。精製した調製物の抗体濃度を、1.4の値を使用して、280nmでの吸光度測定によって決定した。

#### D. N末端欠失したhLF変異体の発現および精製

アミノ酸Ser<sup>1</sup>~Lys<sup>111</sup>をコードする発現ベクターpCMV/hLF<sup>1-111</sup>を、記載のように[9]Transformer<sup>1</sup>部位特異的変異誘発キットで産生した。変異誘発プライマー配列は、ヌクレオチド352~364の欠失を作製するためにhLF cDNAのヌクレオチド365~379 (太字; [2]) に融合したウシaS<sub>1</sub>カゼインシグナル配列の最後の14ヌクレオチド (下線: [10]) からなった [5' CTGTTGCTCTTGCCAGTGTTCAGTGGTGC3'] であった。pCMV/hLF<sup>1-111</sup>を構成的に発現するヒト293(S)[ATCC CRL 1537]細胞を、記載のように[9]生成し、そして50U/mlペニシリンおよび50μg/mlストレプトマイシンを補充したダルベッコ改変イーグル培地で無血清馴化した。S Sepharoseを上清と4時間バッチ式でインキュベートし、カラムに注ぎ、そして20mMリン酸ナトリウム、0.5M NaCl、pH7.5で溶出した。S Sepharose溶出物を、20mMリン酸ナ

### G. 固相リガンドへのhLF結合の競合阻害

ビオチン化hLF (100ng) を、PTG中の競合物の連続希釈と16時間ブレインキュベートし、上記のようにコーティングしたマイクロタイタープレートに添加した。2時間後、プレートを洗浄し、そしてストレプトアビジンビオチン化HRP0複合体と30分間インキュベートした。第2の洗浄後、基質溶液を添加した。さらなる手

順を記載のように行った。結果を、競合物なしでのビオチン化hLFの応答の阻害のパーセントとして表した。

### H. 組換えN-またはC-ローブ (lobe) に対するモノクローナル抗hLF抗体エピトープのマッピング

Polysorbプレートを、1  $\mu$ g/ml精製mAbを含むPBSで20°Cにて16時間コーティングした。プレートを洗浄し、そして天然hLF (100ng/ml) の連続希釈および組換えN-ローブまたはC-ローブのいずれかを分泌する安定な293(S)細胞株の馴化培地と2時間インキュベートした。洗浄後、結合したhLFを、記載のように、ペルオキシダーゼ結合したウシ抗hLFで検出した。

### I. 抗hLF-Sepharoseへの異なるhLF種の結合を比較するためのRIA手順

これらのRIAの技術手順は、hLF抗原についてのRIAについて記載されたとおりであった。簡単にいえば、Sepharoseにカップリングした抗hLF mAbを、hLF改変体の連続希釈物とインキュベートした。結合したhLFを、ポリクローナル<sup>125</sup>I-抗hLF抗体との続いてのインキュベーションによって検出した。結果を、添加した標識した抗体の総量の結合パーセントとして表した。

## II. 結果

A. ヒトラクトフェリンは、ヘパリン、リピド (lipid)、hLZ、およびDNAと特異的に相互作用する。

固相リガンド結合アッセイを、ヘパリン、リピドA、hLZ、およびDNAとのhLFの相互作用を研究するために開発した。図1は、マイクロタイタープレートに固定したリガンドのそれぞれに対する天然hLFの結合を示す。hLFを、コーティングしていないプレートまたはウシ血清アルブミンでコーティングしたプレートとイ

hLF-リガンド相互作用におけるhLF N末端での4つの連続するアルギニン（「第1の塩基性クラスター」）の寄与を描写するために、ヘパリン、リピドA、hLZ、およびDNAへのN末端が欠失したhLF種の結合を研究した。hLF<sup>-1</sup>と命名し

た、Gly<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>を欠く天然hLFは、N末端未処理hLFよりも、ヘパリン、リピドA、hLZ、およびDNAに対してそれぞれ2、1.5、3、および3倍低い親和性を示した（表2）。hLF<sup>-1</sup>と命名した、Gly<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>を欠く天然hLFは、ヘパリン、リピドA、hLZ、およびDNAに対してそれぞれ8、4、17、および17倍低い親和性を示した。hLFの結合は、Arg<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>を欠く変異体rhLF<sup>-1</sup>ではなかった（表2）。これらの結果は、4つのすべてのアルギニンが、ヘパリン、リピドA、hLZ、およびDNAとhLFとの相互作用に寄与すること、および第1の塩基性クラスターの除去がこれらのリガンドとhLFとの相互作用を消滅させることを示す。

表 2

ヘパリン、リピドA、hLZ、およびDNAへのN末端欠失したhLF種の結合

	反応性 (%)			
	ヘパリン	リピドA	hLZ	DNA
天然hLF	100	100	100	100
hLF <sup>-2N</sup>	55.6±4.1	67.8±10.2	37.5±12.4	31.2±2.1
hLF <sup>-3N</sup>	12.7±2.0	25.7±3.1	5.1±2.1	5.8±1.2
rhLF <sup>-5N</sup>	結合なし	結合なし	結合なし	結合なし

C. モノクローナル抗体E11はhLF-リガンド相互作用を阻害する。

10の異なる精製抗hLF mAbを、固定されたりガンドへのhLFの結合を阻害する能力について試験した。図3の結果は、hLFの抗hLF mAb E11とのブレインキュベーションが、ヘパリン(A)、リピドA(B)、およびhLZ(C)とhLFとの相互作用を完全にブロックし得るが、コントロールmAbはhLF結合に影響を及ぼさなかったことを示す。固相リガンドへのhLF結合を完全に防止するために必要とされる、ブレインキュベーション混合物中のmAb E11およびhLFのモル比の差は、おそらく、各リガンドおよびmAb E11に対するhLFの親和性の差（異なるリガンドおよびmAbとのh

これらのデータは、単一の領域Arg<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>が、hLZおよびポリアニオン（ヘパリン、リピドA、DNAのような）とhLFとの特異的静電的相互作用を決定することを示す。データは、ヘパリン、リピドA、hLZ、およびDNAとhLFの相互作用において4つのアルギニンのN末端から2番目のストレッチの必須の役割を、明確に証明する。結合は、連続するArg残基の除去において減少し、そしてArg<sup>1</sup>~Arg<sup>1</sup>を欠く変異体であるrhLF<sup>1-4</sup>では消滅した。後者の観察は、Arg<sup>1</sup>およびArg<sup>1</sup>がhLF-GAG相互作用に重要であると結論した、Mannら、前出と一致する。しかし、1つまたは2つのN末端アルギニン残基を欠く天然hLF種でのここで示される結果は、Arg<sup>1</sup>およびArg<sup>1</sup>がまた、ヘパリン、リピドA、hLZ、およびDNAとhLFとの相互作用に寄与することを示す。残基Arg<sup>1</sup>およびArg<sup>1</sup>が、ヒト、ヒツジ、ウマ、ウシ、およびブタLFに保存されることは注目すべきことである。マウスLF（mLF）は、これらの位置で1対の塩基性残基を欠く[32]。実際、mLFは、Mono Sクロマトグラフィー[1]において0.3M NaClで、すなわち、実際にrhLF<sup>1-4</sup>と同じ位置で溶出し、そしてリガンドへのhLFの結合と競合しない。

変異体rhLF-5Nは、20μg/mlまでの濃度が固相結合アッセイで添加される場合でさえ、任意のリガンドと相互作用する能力を喪失した。さらに、LPSおよびヘパリンへの組換えC-ローブの結合は検出可能ではない。明らかに、N-ローブの第1の塩基性クラスターArg<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>に相同である、C-ローブの塩基性クラスターArg<sup>111</sup>-Arg<sup>111</sup>-Ala<sup>111</sup>-Arg<sup>111</sup>は、これらのリガンドと相互作用し得ない。これは、Arg<sup>111</sup>-Arg<sup>111</sup>-Arg<sup>111</sup>-Arg<sup>111</sup>の前の3つの連続するグルタミン酸（Glu<sup>111</sup>-Glu<sup>111</sup>-Glu<sup>111</sup>）および／または正電荷の表面曝露によるものであり得る。N末端トリプシン処理フラグメントでのC末端トリプシン処理フラグメントの少量の夾雑は、LPSへのC末端トリプシン処理フラグメントの見かけの結合を説明するようである[11]。鉄を含まないhLFおよび鉄飽和したhLFは、ヘパリン凝固活性を中和する同じ能力を有することが見いだされている[3]。天然のhLFおよび鉄飽和したhLFが、ヘパリン、リピドA、およびhLZへのhLFの結合について等しく十分に競合したことを表1で示し、これは、両方のhLF種がこれらのリガンドについて同一の親和性を有することを示唆する。したがって、鉄の取込みの際

ることが示されている。RNAおよびDNAは、hLFがナチュラルキラー細胞の細胞傷害性を増加させる能力を阻害した[14]。リビドAとhLFのブレインキュベーションは、ヘパリンへの結合を完全にブロックし得た。hLFのLPSでの夾雑は、hLFの骨

髄抑制効果[33]、単球性IL-1およびTNF放出の抑制、ならびに増強されたfMLPが引き起こしたスーパーオキシド放出についての好中球のLPSプライミングの阻害[4]を除去する。0.4M NaClでの乳汁からのhLFのバッチ式抽出は、hLZおよびLPSでのこのタンパク質の夾雑を抑制する効果的手段である。しかし、また、N末端短縮したhLFが、いくつかの他の生物学的系においてインタクトなhLFより高い比活性または他の異なる性能を提示し得るようである。循環からのhLFの迅速な肝クリアランスは、少なくとも2つのクラスのhLF結合部位、すなわち、多数の低親和性結合部位（おそらく細胞会合型プロテオグリカン）およびキロミクロンレムナントレセプターおよび／またはLDL-レセプター関連タンパク質（LRP）を提示するさらに少数の高親和性結合部位を含む[15、16]。Ziereらは、ラット肝細胞キロミクロンレムナントレセプターへの結合およびその後のインターナリゼーションが、最初の14個のN末端残基がアミノペプチダーゼ処理によって除去されているhLFで増加したことを示した[16]。N末端短縮されたhLF種では、細胞表面に会合した硫酸化分子への切断されたhLFの「低親和性」結合は、Jurkatヒトリンパ芽球T細胞における豊富な低親和性結合部位を示す。これらの結果は、特異的レセプターへのhLFの結合が、hLFの第2の塩基性クラスターを含むという明らかな証拠を提供する。したがって、hLFの制限されたN末端タンパク質分解は、より大きな割合のhLFを特異的レセプターに結合するようにシフトさせ、したがっておそらくhLF免疫調節活性を変化させ得る。

## 実施例 2

この実施例は、LF改変体が、Jurkat細胞LFレセプターに高親和性で結合するが、硫酸化細胞表面分子には結合しないかまたは天然LFに比較して低い親和性で結合することを証明する。

### I. 材料および方法



M NaClを含む緩衝液 A で洗浄し、そして0.5M NaClを含む緩衝液 A でのブロッキングによって溶出した。S-Sepharose溶出画分を、緩衝液 A 中でMono S HR 5/5カラム(Pharmacia, Upsalla, Sweden)に戻した。結合したタンパク質を、15ml

緩衝液 A 中 0 ~ 0.5M NaClの線型塩勾配で0.5ml/分の流速で溶出した。0.28M NaClで溶出するマウスLfを、さらなる実験に使用した。タンパク質の均一性を、SDS/PAGE[25]によってチェックした。ラクトフェリンの鉄飽和を、他[26]に記載のように行った。ヒト血清トランスフェリンを、Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.) から得た。非改変rhLfを、[27]に記載のようにつづいた。

#### C. アミノ酸 1 ~ 5 を欠く N 末端欠失したhLf変異体の発現および精製

hLfをコードする全長2.3kbp cDNAを、記載[28]のように、ヒト乳腺cDNAライブラリー (Clontech, Palo Alto, CA, U.S.A.) から得た。Sculptorインビトロ変異誘発システムキット(Amersham International, Amersham, Bucks, U.K.)を使用して、hLfのGly<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>をコードする配列5'-GGCCGTAGGAGAAGG-3'[19]を欠失した。この目的のために、変異誘発オリゴヌクレオチド: 5'-CTGTGTCTGGCTAGTGTTCA GTGGTG-3'を合成した。変異誘発のためのテンプレートは、ファージM13mp11であり、これはpBluescript SKプラスミド[28]にクローニングしたコード配列の310bp EcoRI-AccIフラグメント (ヌクレオチド295~606[19]) を含んでいた。変異誘発後、欠失を、DNA配列分析によって確認し、そして変異したEcoRI-AccIフラグメントを、記載[28]のようにhLfの全長cDNAの3'相補的部分とともに、pBluescript SKに連結し戻した。最後に、変異したcDNAを、pVL1392にサブクローニングし、pVL1392-rhLf<sup>'</sup>構築物を得た。組換えバキュロウイルス、Sf9昆虫細胞培養物の産生、およびN末端欠失したrhLf変異体 (本明細書では以下「rhLf<sup>'</sup>」と命名した) の産生を、[27]に報告されるようにつづいた。組換えタンパク質を、0.2M酢酸ナトリウム、pH7.8で平衡化したSP-Sepharose Fast Flowカラムで、細胞培養培地から精製し、そして0 ~ 1 M NaClの線型塩勾配で溶出した。rhLf<sup>'</sup>の純度を、7.5% SDS-PAGEでチェックした。rhLf<sup>'</sup>のN末端アミノ酸配列分析を、Applied BioSystem 477 Protein Sequencerを使用して、エドマン分解手順によってつづいた。



を用いて評価した。

#### H. 細胞結合実験

平衡結合実験を、0.4% (w/v) ヒト血清トランスフェリンを含む無血清RPMI 1640中に行って、hLfの細胞またはプラスチックへの非特異的結合を防止した。5.10<sup>6</sup>細胞を含むアリコート (100ml) を、1.5mlポリプロピレン遠心チューブに添加し、そして<sup>125</sup>I-標識したタンパク質の連続希釈物 (0 ~ 80nMの範囲の濃度) とともにインキュベートした。タンパク質との細胞のインキュベーションを、0.01% (w/v) アジ化ナトリウムの存在下で4℃にて1時間行って、リガンドインタナリゼーションを防止した。細胞を、1ml RPMIを用いる7分間の180gでの遠心分離によって3回洗浄し、0.5ml PBSに再懸濁し、そして結合した放射能を測定した。非標識hLfの100倍モル過剰の存在下で測定した非特異的結合は、代表的には、総結合の約25%であり、そして特異的結合を得るために総結合から差し引いた。結合パラメータ (Kdおよび細胞当たりの結合部位数) を、Enzfitterプログラムソフトウェア1.05 (violet Software) を使用して、スキッチャードプロット分析[29]によって算出した。

## II. 結果

#### A. N末端欠失したhLf改変体の調製

ArgおよびLys残基の後ろを特異的に切断するセリンプロテアーゼである、トリプシンによるhLfの制限されたタンパク質分解を研究した。5mg量の天然のhLfを、PBS中37℃にて1:8の酵素:基質モル比でトリプシンとともにインキュベートした。切断を、12倍モル過剰のSBTIの添加によって1、5、25分、および3時間後に停止し、そしてN末端の完全性を、分析用Mono Sクロマトグラフィー[18]によって評価した。結合したタンパク質を、30ml緩衝液A中0 ~ 1.0M NaClの線型塩勾配を用いて1.0ml/分の流速にて溶出した。溶出したタンパク質を、280nmでの吸光度測定によって検出した。相対量 (%) を、ピーク面積を積分することによって算出した。表3は、1分間のトリプシン処理後に、20%および80%のhLf分子が、それぞれ残基Gly<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>またはGly<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>を欠くので、すべてのhLf分

。したがって、さらにrhLf<sup>1-1</sup>と命名した、最初の5つのN末端アミノ酸のいずれかを欠く組換えhLf (rhLf) 変異体を発現した。線状化したバキュロウイルスおよびpVL1392-rhLf<sup>1-1</sup>を使用して、Sf9細胞を形質転換し、そしてrhLf<sup>1-1</sup>発現クローンをELISA[17]によって選択した。このクローンの培養培地を、SP-Sepharose Fast Flowカラムにロードし、そしてrhLf<sup>1-1</sup>は、0.4M NaClで単一ピークとして溶出した。タンパク質は、SDS-PAGEによってMr 78,000の単一タンパク質のバンドとして現れた。rhLf<sup>1-1</sup>のN末端、Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Valを、アミノ酸配列分析によって確認した。組換え体hLf<sup>1-1</sup>を、培養培地1mlあたり8mgの最大収量で得た。

#### C. 天然のLfおよびN末端欠失したhLf種のJurkat細胞への結合

Jurkatヒトリンパ芽球T細胞への結合におけるhLfのArg<sup>1</sup>-Arg<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Arg<sup>5</sup> (「第1の塩基性クラスター」)の役割を描写するために、0~80nMの範囲の濃度での<sup>125</sup>I-標識した天然のhLfおよびN末端欠失したhLf種の結合を研究した。図7は、すべてのhLf種の結合が、濃度依存的および飽和可能であったことを示す。さらに、すべてのタンパク質の結合を、非標識ラクトフェリンの100倍モル過剰の存在下で約75%阻害し、これは、結合が可逆的および特異的であったことを示唆した。スキッチャード分析は、使用したhLf濃度の範囲で、N末端欠失したhLfの親和性が、N末端がインタクトなhLfと比較した場合、有意に増加したことを示した(図8a)。Kdは、hLfまたはrhLfについての69または81nMから、hLf<sup>1-1</sup>、hLf<sup>1-2</sup>、およびhLf<sup>1-3</sup>についての65、57、および41nMまでそれぞれシフトした。rhLf<sup>1-1</sup>について顕著に減少した12.4nMのKdが観察された。さらに、細胞当たりの結合部位の数が、N末端がインタクトなhLfについての110,000から、hLf<sup>1-1</sup>およびrhLf<sup>1-1</sup>の両方についての20,000まで減少したことが見いだされた(図8b)。hLf<sup>1-1</sup>およびhLf<sup>1-2</sup>は、それぞれ約75,000および35,000の結合部位に結合した。これらの結果は、Jurkat細胞上の約80,000の結合部位へのhLfの結合が、Gly<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>-Arg<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>の存在に依存することを示唆する。

ラクトフェリン-Jurkat細胞相互作用の種特異性を評価するために、<sup>125</sup>I-hLf

## III. 議論

この実施例は、リンバ芽球細胞株Jurkatへのこのタンパク質の結合におけるhLfのArg<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>の役割を示す。

天然のhLfの制限されたトリプシン処理タンパク質分解によって、Gly<sup>1</sup>Arg<sup>1</sup>、Gly<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>、またはGly<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>のいずれかを欠く、大量のN末端欠失hLf改変体を得る。表3の結果は、Arg<sup>1</sup>の後ろの切断が、Arg<sup>1</sup>の後ろの切断の前に起こることを示す。hLf<sup>1-1</sup>を得る、Arg<sup>1</sup>の後ろのペプチド結合のその後の切断は、ずっと遅い速度で起こる。SDS-PAGE分析は、使用した穏和な加水分解条件下で、タンパク質分解が主としてN末端で起こったことを示した。Lys<sup>1-1</sup>の後ろの内部トリプシン処理タンパク質分解は、切断の3時間後に総hLf分子の3%未満のみで示されたが、2、49、および42%の分子は、それぞれ、4、3、および2つのN末端残基を欠いた。これらの結果は、N末端のトリプシン処理タンパク質分解が、Lys<sup>1-1</sup>での主なトリプシン切断部位の後ろの切断の前に起こることを明確に示す。したがって、hLfのN末端の分解は、外分泌物で容易に達成されるようであり、このプロセスの生理学的重要性が疑われる。

天然のhLfのJurkat細胞への結合パラメータは、既述[34]のパラメータに近かったが、N末端アルギニンの1つのその後の除去は、親和性の漸増的増加、ならびに細胞当たりの結合部位の数の減少を生じた。これらの結果は、hLfのArg<sup>1</sup>、Arg<sup>1</sup>、およびより低い程度でArg<sup>1</sup>が、総結合の約80%を示すJurkat細胞上の「低親和性」結合部位へのhLfの結合に相乗的に関連することを示す。hLfからのArg<sup>1</sup>の除去は、おそらくLf特異的レセプターを表す、Jurkat細胞上の約20,000の「高親和性」結合部位についてのhLfの親和性を強力に増加させた(図8)。したがって、Arg<sup>1</sup>は、ラクトフェリンレセプター結合部位の一部として既に同定された領域である[21]、第2の塩基性クラスター(Arg<sup>1-1</sup>-Lys<sup>1-1</sup>-Val<sup>1-1</sup>-Arg<sup>1-1</sup>)にhLfリンバ球レセプターが到達するための立体障害を提供するようである。これはまた、Arg<sup>1</sup>が、トリプシン処理後にhLfから放出され得ない理由を説明する。hLfのX線結晶学的解析データ[20]は、実際、Arg<sup>1</sup>が、水素結合によってタンパク質コアに連結されることを示す。したがって、Arg<sup>1</sup>は、hLfの他の分子と

のN末端欠失したhLf変体の定量的調製物は、リンパ球細胞の表面で発現する異なる結合部位の生物学的役割へのさらなる洞察を得る機会を提供する。

#### 参考文献

1. Nuijens et al. (1996). Structure and biological actions of lactoferrin. *Journal of Mammary Gland Biologie and Neoplasia* 1: 285-295
2. Rey et al (1990). Complete nucleotide sequence of human mammary gland lactoferrin. *Nucleic Acids Res.* 18: 5288
3. H. F. Wu, R. L. Lundblad, and F. C. Church. (1995). Neutralization of heparin activity by neutrophil lactoferrin. *Blood* 85: 421-428
4. D. Wang, K. M. Pabst, Y. Aida, and M. J. Pabst. (1995). Lipopolysaccharide-inactivating activity of neutrophils is due to lactoferrin. *J. Leukoc. Biol.* 57: 865-874
5. P. H. C. Van Berkel, M. E. J. Geerts, H. A. van Veen, P. M. Kooiman, F. Pieper, H. A. de Boer, and J. H. Nuijens. (1995). Glycosylated and unglycosylated human lactoferrins can both bind iron and have identical affinities towards human lysozyme and bacterial lipopolysaccharide, but differ in their susceptibility towards tryptic proteolysis. *Biochem. J.* 312: 107-114
6. R. T. Ellison III, and T. J. Giehl. (1991). Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J. Clin. Invest.* 88: 1080-1091
7. J. H. Nuijens, C. C. M. Huijbregts, G. M. Van Mierlo, and C. E. Hack. (1987). Inactivation of C1 inhibitor by proteases: demonstration by a monoclonal antibody of a neodeterminant on inactivated, non-complexed C1 inhibitor. *Immunology* 61: 387-389

16. G. J. Ziere, M. K. Bijsterbosch, and T. J. van Berkel: (1993). Removal of 14 N-terminal amino acids of lactoferrin enhances its affinity for parenchymal liver cells and potentiates the inhibition of beta- very low density lipoprotein binding. *J. Biol. Chem.* 268: 27069-27075
17. Mikogami, T., Heyman, M., Spik, G. and Desjeux, J.F. (1994) *Am. J. Physiol.* 267, G308-G315
18. van Berkel, P.H.C., Geerts, M.E., van Veen, H.A., Kooiman, P.M., Pieper, F.R., de Boer, H.A. and Nuijens, J.H. (1995) *Biochem. J.*, 312, 107-114
19. Rey, M.W., Woloshuk, S.L., De Boer, H.A. and Pieper, F.R. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18, 5288
20. Anderson, B.F., Baker, H.M., Norris, G.E., Rice, D.W. and Baker, E.N. (1989) *J. Mol. Biol.* 209, 711-734
21. Legrand, D., Mazurier, J., Ellass, A., Rochard, E., Vergoten, G., Maes, P., Montreuil, J. and Spik, G. (1992) *Biochemistry* 31, 9243-9251
22. Baeuerle, P.A. and Huttner, W.B. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141, 870-877
23. Keller, K.M., Brauer, P.R. and Keller, J.M. (1989) *Biochemistry* 28, 8100-8107
24. Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dorland, L., van Halbeek, H., Vliegthart, J.F.G. (1982) *Eur. J. Biochem.* 121, 413-419
25. Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)* 227, 680 - 685
26. Mazurier, J. and Spik, G. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 629, 399-409
27. Salmon, V., Legrand, D., Georges, B., Slomianny, M.-C., Coddeville, B. and Spik, G. (1996) *Protein Expression and Purification* - in press
28. Legrand, D., Salmon, V., Coddeville, B., Benaïssa, M., Plancke, Y. and Spik, G. (1995) *FEBS Lett.* 365, 57-60

生理学的結果を研究するために、一連の実験を、WB-アッセイでラクトフェリンと行った。WBが、ヘパリン処理した血液で、またはTFPI（組織-因子経路インヒビター）で抗凝固したWBで、行われた場合、前炎症性サイトカイン産生に対するラクトフェリンの効果で有意な差が示された。ヒトラクトフェリンがヘパリンに結合することが証明されている（van Berkelら, Biochem. J. 328, 145-151(1997)、Wuら, Arch. Biochem. Biophys. 317, 85-92(1995)、Mannら, J. Biol. Chem. 269, 23661-23667(1994)）。この相互作用は、インビトロでヘパリン活性の中和を生じる（Wuら, Blood 85, 421-428(1995)）。ラクトフェリンがヘパリンの抗凝固活性を阻害する能力を、ラクトフェリンの存在または非存在で抗凝固された全血培養物中でTAT複合体の量を測定することによって決定した。

## II. 方法

### A. プロトコル

新鮮なヒト血液を、培養培地（IMDM, Biowithaker）で10倍希釈し、そして100  $\mu$ g/mlラクトフェリンの存在または非存在で種々の濃度のヘパリン（Leo, Leo W eesp）で抗凝固化した。ウェルを、37°Cにて2時間インキュベートした。サンプルを上清から採取し、そしてTAT複合体の量をELISAによって決定した。

### B. タンパク質

天然hLF（Batch 67）、トランスジェニックhLF、ウシラクトフェリン、および市販のバッチServa hLF(Feinbiochemica, Heidelberg)を使用した。hLF<sup>1-11</sup>（Gly<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>を欠く）を、Serva hLF(Feinbiochemica, Heidelberg)から単離した。

## III. 結果

種々のラクトフェリン種での結果を、図14に示す。100  $\mu$ g/ml hLFの存在下では、約10倍多いヘパリンが、十分な抗凝固化された血液を得るために添加されなければならない（TAT値<20ng/ml）。ウシからのトランスジェニックhLFおよびマウスからのゲノムトランスジェニックhLFとの類似の曲線を得、これらが同様に良好にヘパリンを中和することを示した。hLF<sup>1-11</sup>は、N末端未処理hLFと比較した場合、8倍低い親和性でヘパリンに結合する。ServaのPeak IIIおよび天然h



ら, Biochim. Biophys. Acta 45, 413-421(1960))。1979年には、Coxらは、ヒト十二指腸粘膜の小片および $^{55}\text{Fe}$ 標識したhLFフラグメントを使用して、hLFからの鉄取り込みプロセスの証拠を提供した(Coxら Biochim. Biophys. Acta 588, 120-128(1979))。ウシラクトフェリン(bLF)からの取り込みが数倍減少しそしてヒトトランスフェリンおよびニワトリオボトランスフェリン(Ovatransferin)から観察されたので、この取り込みプロセスは、種およびタンパク質特異的であるようであった。これらの知見の後、母乳を与えられている乳児の糞便中の未処理のhLFの存在は、hLFが胃腸管の通過中にタンパク質分解攻撃を免れ得、そしてhLFが鉄吸収に関連し得るという考えを強化した(Spikら Acta Pediatr. Scand. 71, 979-985(1982))。

上記のように、本発明者らは、リンパ球上のhLF結合部位の2つのクラスの存在を同定した(Legrandら Biochem. J. 327 841-846(1997)も参照のこと)。1つのクラスは、hLFの低親和性結合および多数の結合部位を示すが、第2のクラスは、高親和性結合および細胞当たり少数の結合部位を示す(前出、Legrandら Biochem. J. 327 841-846(1997))。天然および組換えhLF改変体との結合研究は、hLFの第1の塩基性クラスターが、低親和性結合部位(おそらく、細胞会合したプロテオグリカン)と相互作用することを示した。hLF N末端におけるカチオン性残基の第2の塩基性クラスターは、リンパ球上の推定hLFレセプターとの高親和性相互作用に関連する。したがって、腸細胞上のhLF結合部位の2つのクラスの存在は、既に観察された腸細胞へのhLFの結合特性を説明し得る。この実験において、本発明者らは、N末端未処理hLFの結合パラメータをN末端分解したhLF改変体のパラメータと比較した。さらに、鉄飽和したhLF、bLF、mLF、およびウシからのトランスジェニックhLFの結合を分析した。

## II. 方法

### A. 結合アッセイ

ヒト結腸癌腫細胞株HT-29(Mikogamiら Am. J. Physiol. 267, G308-G315(1994))からの細胞を調製しそして凍結保存した。細胞を毎週継代培養し、そして10% FCSを含むDMEM中  $2 \times 10^4$  細胞/cm<sup>2</sup> (24ウェルプレート中) に3週間播種し、十



タに差がないことを示す。マウスラクトフェリンは、HT-29細胞に結合しない。

1つのN末端アルギニンの除去は、結合パラメータに小さい影響を有するが、高親和性部位に対する親和性は、124nMの平均値まで減少する。2つのN末端アルギニンの除去後、高親和性結合がなくなった。1回のみの測定であるが、3つのN末端アルギニンを欠くhLFで、同じことが観察される。これらの結果は、N末端欠失したhLF変体のJurkat細胞への結合研究とは異なり、ここでは、N末端アルギニンの除去は、細胞当たりの結合部位の数を減少させるが親和性を増加させる。これらの結果は、HT-29上の特異的レセプターはないが、HT-29に結合する大きい能力のみがあることを示唆する。

表 4 :

種々のラクトフェリン種のHT-29細胞への結合パラメータ。比較的大きい標準変動は、接着細胞の使用に関連する（ウェル対ウェル変動）。

	総結合部位 ( $10^6$ )	高親和性部位 ( $10^5$ )	総親和性 ( $\mu$ M)	高親和性 (nM)	N
天然 hLF	$3.9 \pm 1.5$	$3.3 \pm 1.9$	$1.0 \pm 0.5$	$74 \pm 30$	14
Fe-hLF	$3.2 \pm 0.3$	$2.6 \pm 2.5$	$1.0 \pm 0.3$	$66 \pm 40$	3
トランスフェリンhLF	$2.7 \pm 0.7$	$4.6 \pm 3.5$	$0.9 \pm 0.6$	$88 \pm 45$	3
bLF	$2.9 \pm 1.3$	$3.5 \pm 0.7$	$0.8 \pm 0.5$	$81 \pm 24$	3
mLF	-	-	-	-	3
hLF <sup>2N</sup>	$5.6 \pm 0.6$	$9.3 \pm 4.4^a$	$0.8 \pm 0.1$	$124 \pm 8^a$	3
hLF <sup>3N</sup>	$6.1 \pm 1.5$	-	$1.7 \pm 0.3$	-	3
hLF <sup>4N</sup>	8.9	-	0.7	-	1

a)天然hLFとは有意に異なる ( $P < 0.01$ )。

る。

2)結合は、Arg<sup>1</sup>を含むエピトープに結合する、抗hLF mAb E11によって完全にブロックされる。

3)第1の塩基性クラスター全体を欠くマウスラクトフェリンは、HT-29細胞と相互作用しない。

結果は、さらに、HT-29で発現される特異的hLF-レセプターがないことを示唆する。これらの細胞への結合は、まだ同定されていない成分によってのみ生じる。可能性のある候補物は、グリコサミノグリカンまたはシアル酸（例えば、ムチン

での）である。したがって、hLF-レセプターメカニズムは、結腸での鉄取り込みを担うようではない。本明細書に示される結果に基づいて、これらのhLF改変体は、腸壁に結合せず、そしておそらく排泄される。

明快および理解の目的のために、本発明は、これらの実施例および上記の開示において幾分詳細に記載されている。しかし、特定の変更および改変が、添付の請求の範囲の範囲内で実施され得ることが明らかである。すべての刊行物および特許出願は、それぞれが個々にそのように示されているかのような同じ程度まで、すべての目的のために、その全体が参考として本明細書に援用される。

【 図 3 】

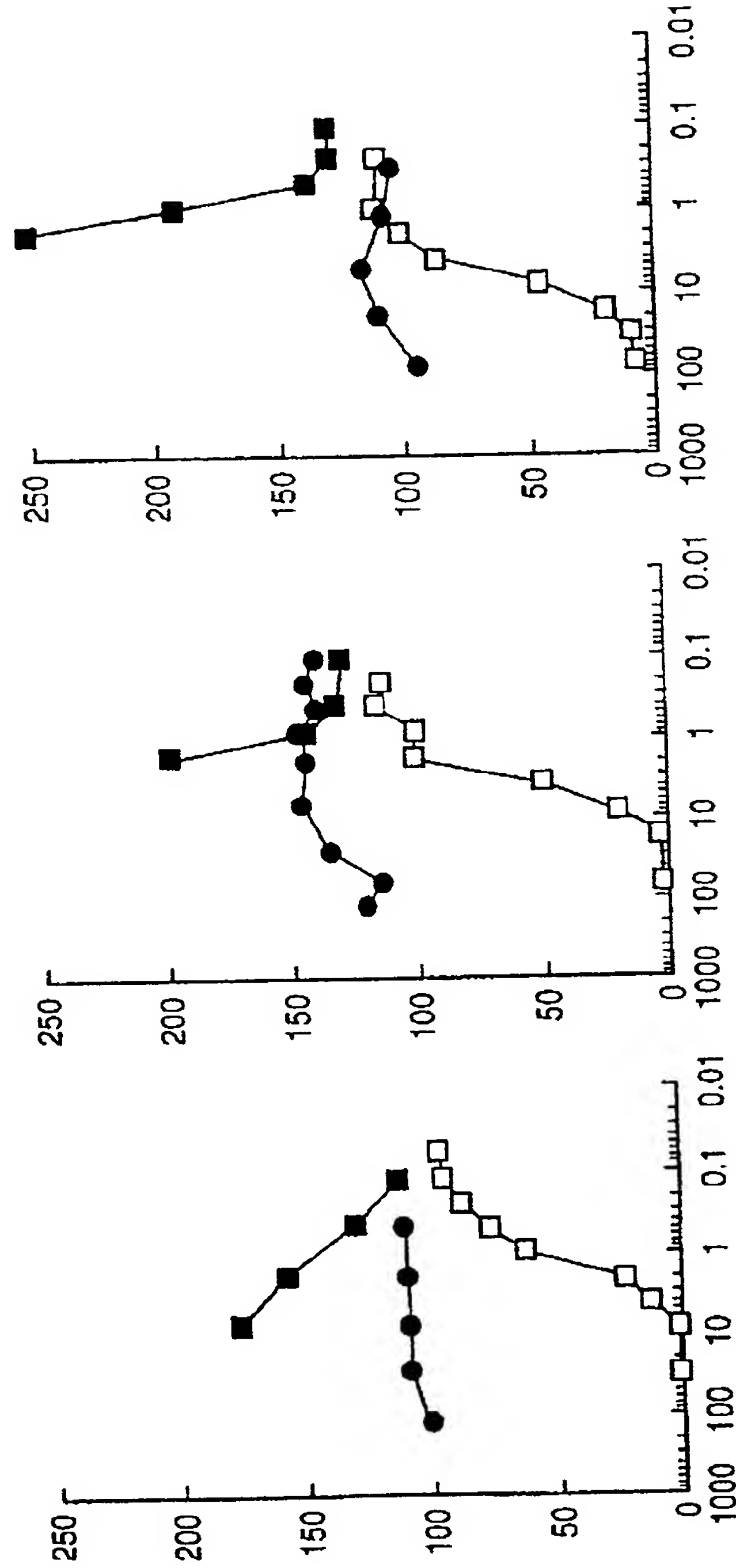


FIG. 3

【 図 5 】

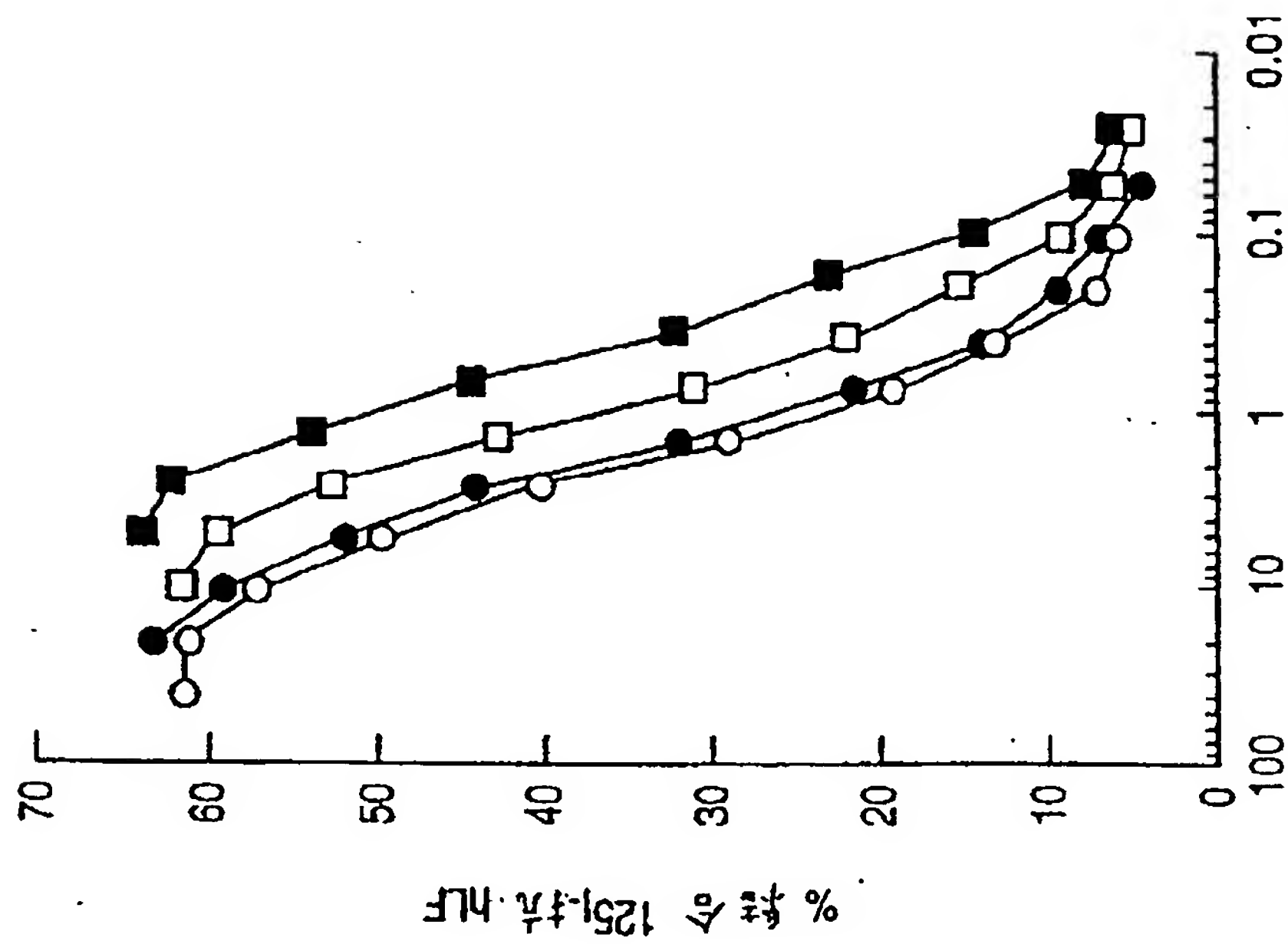


FIG. 5B

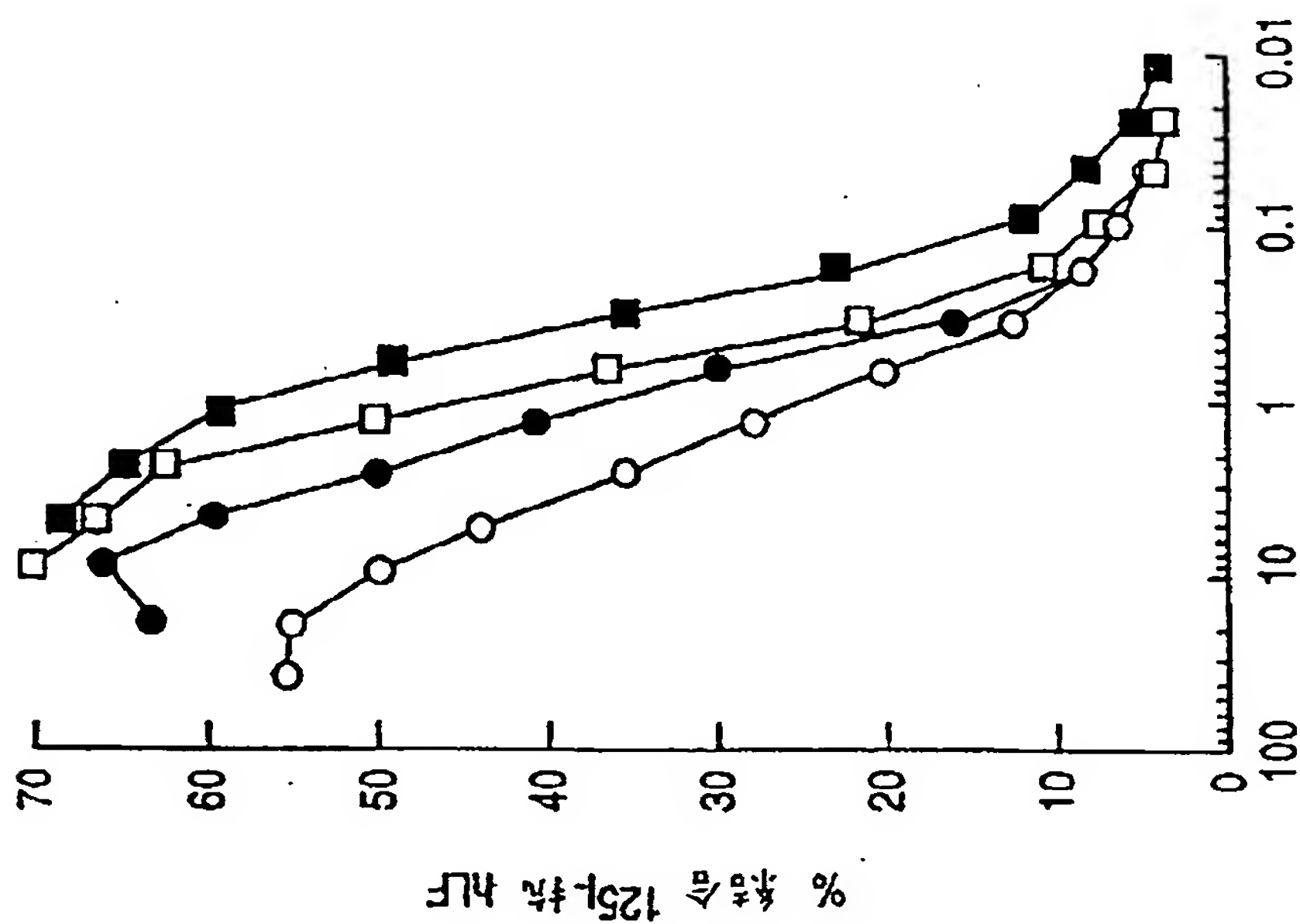


FIG. 5A

【 図 7 】

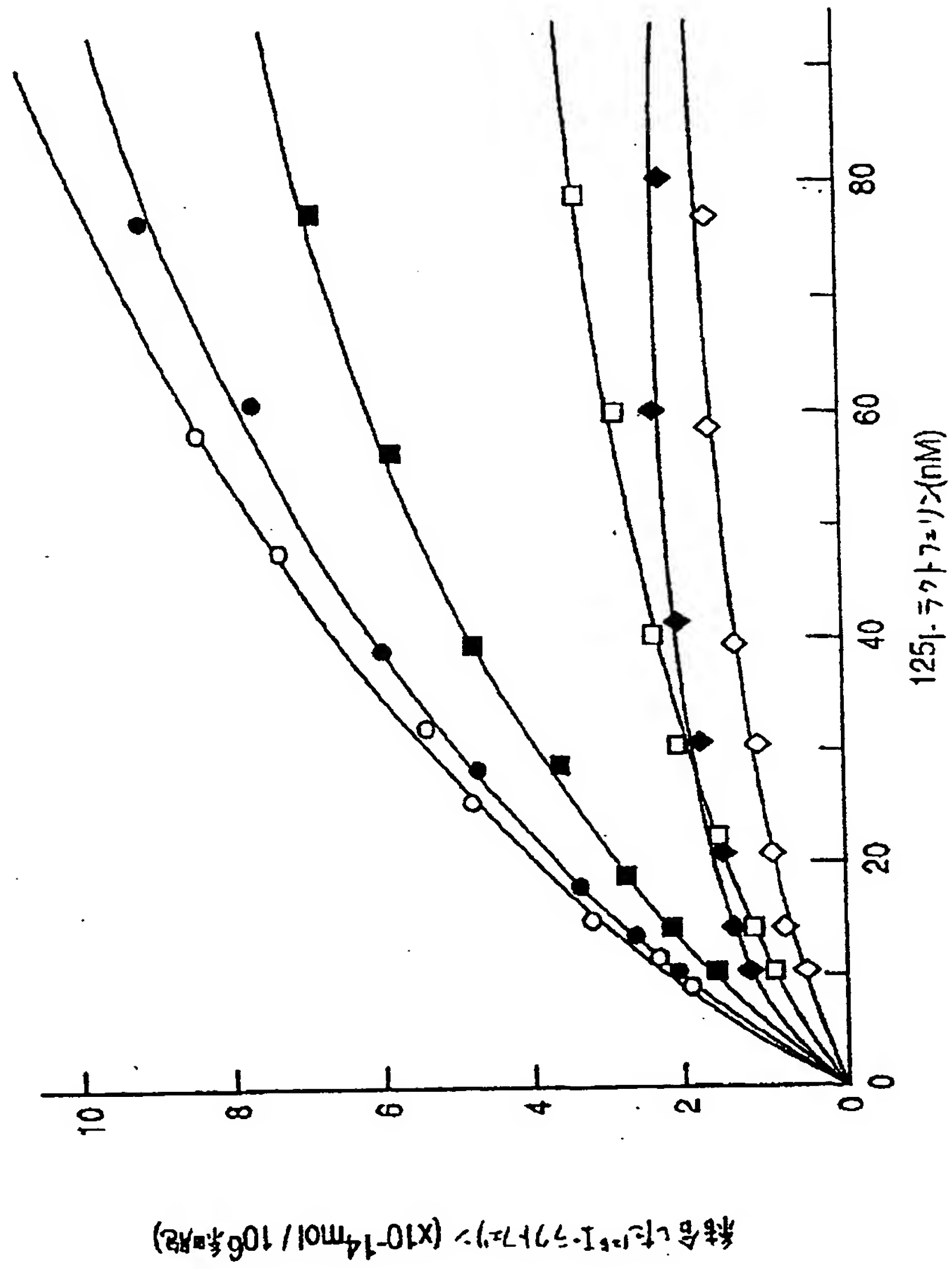


FIG. 7

【 図 9 】

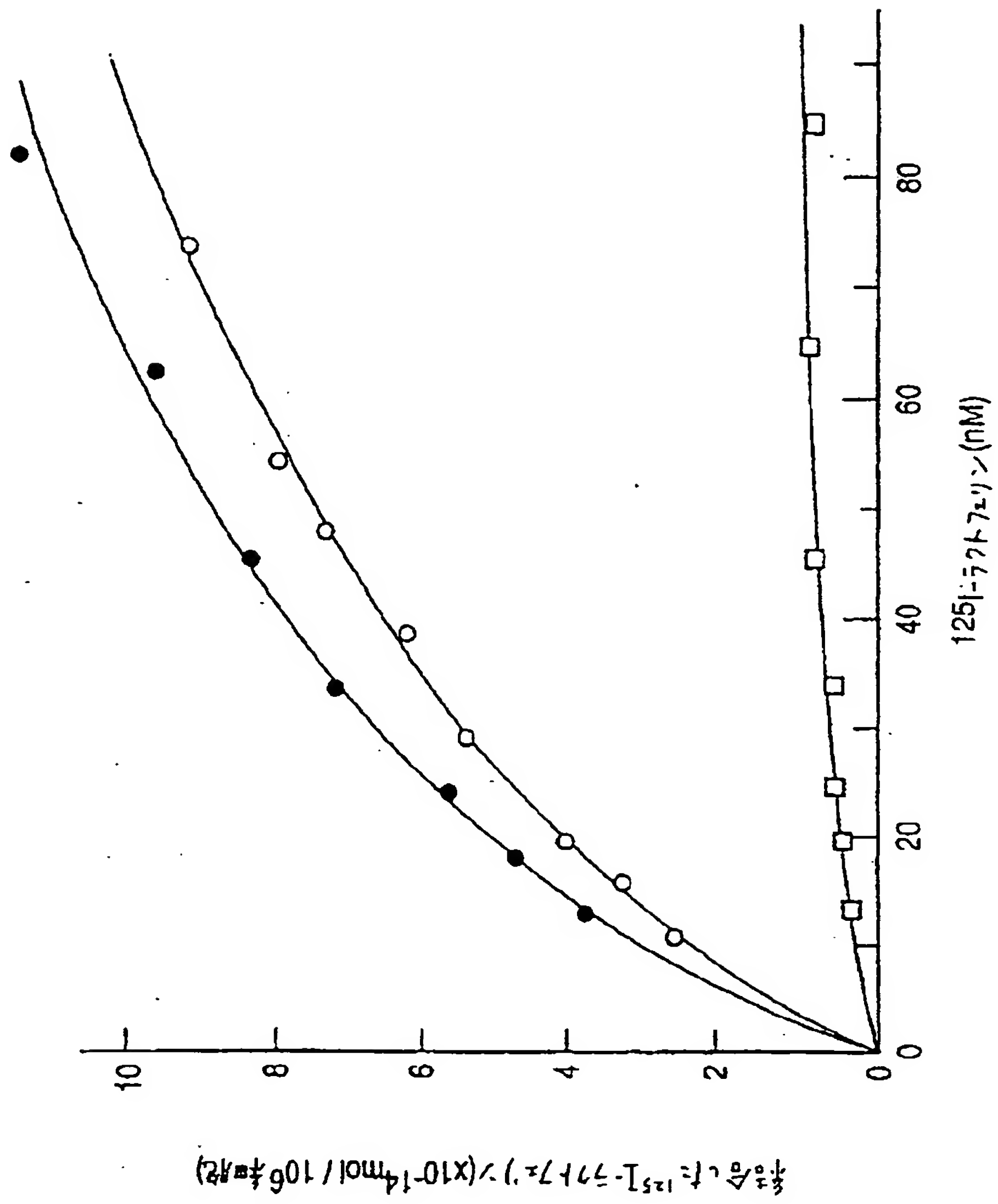


FIG. 9

【 図 1 1 】

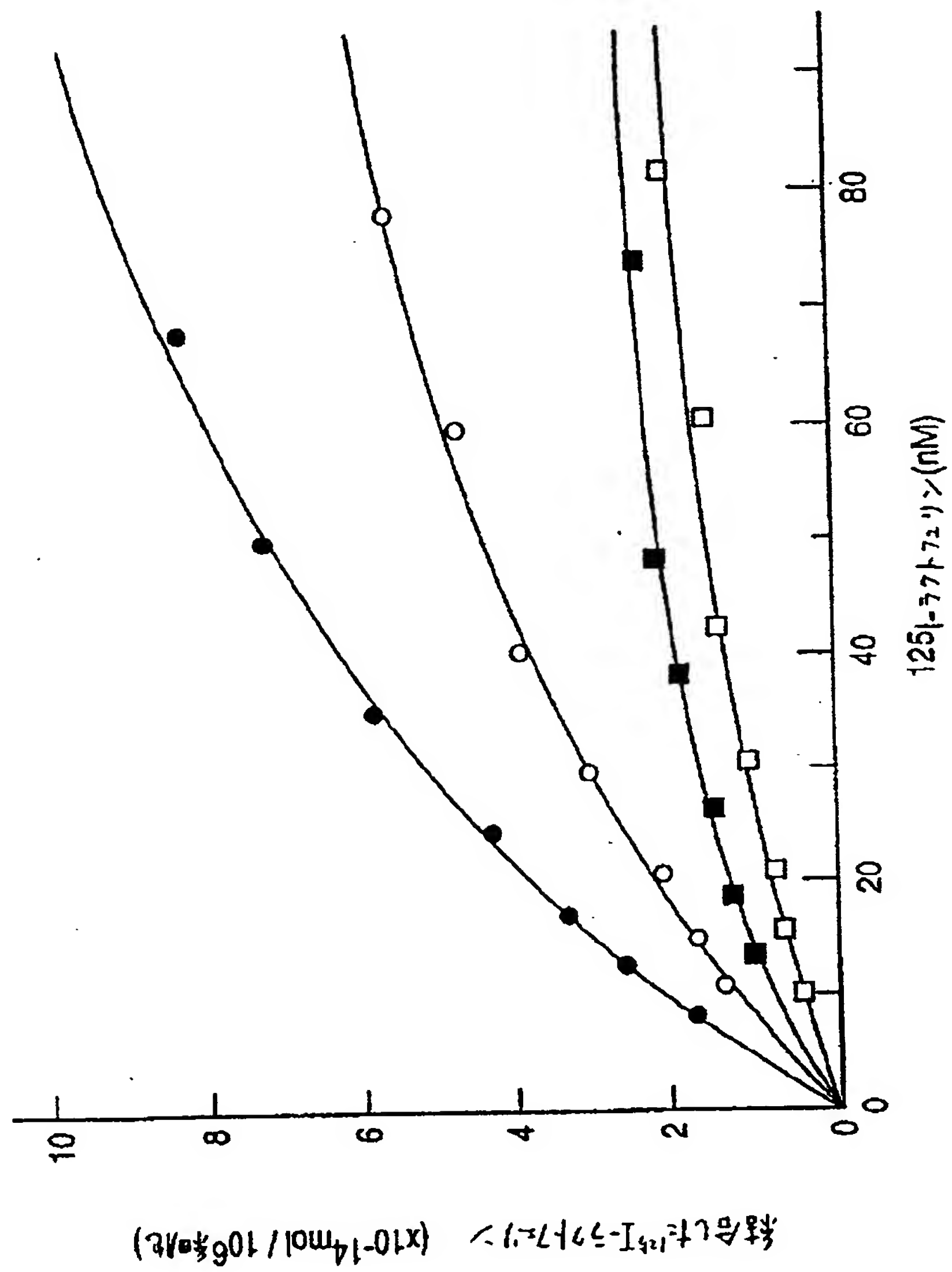


FIG. 11



[ 図 1 3 ]

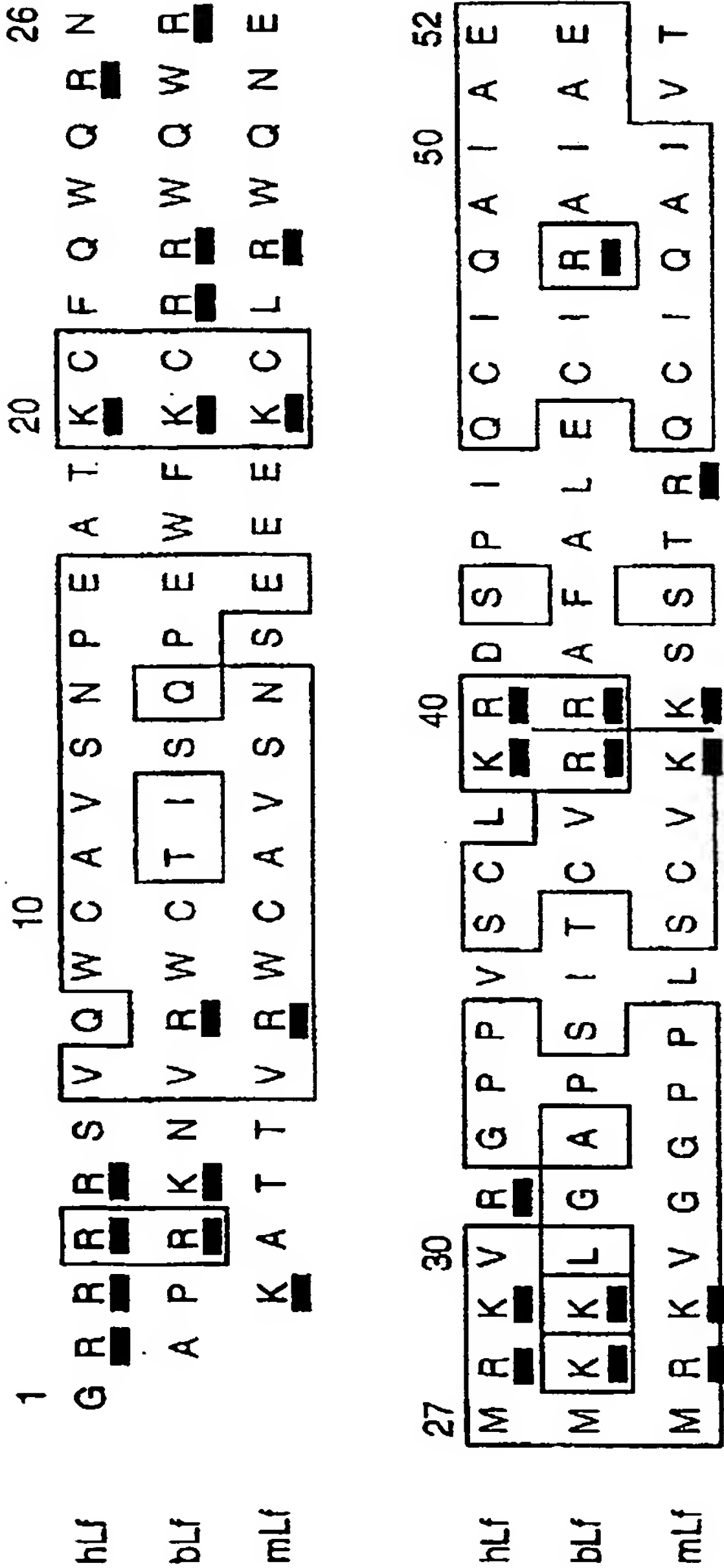


FIG. 13

【 図 1 6 】

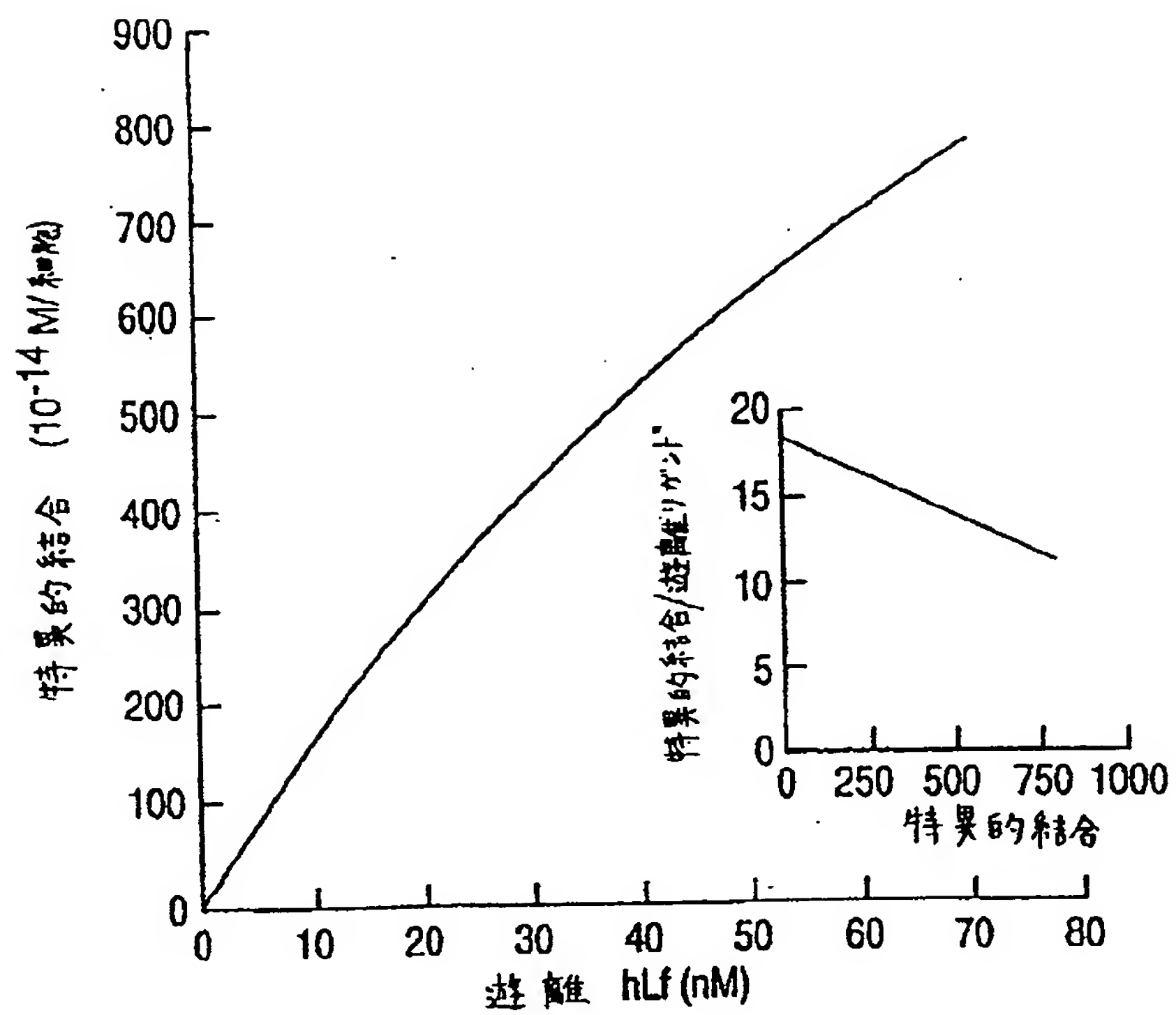


FIG. 16

【 図 1 7 】

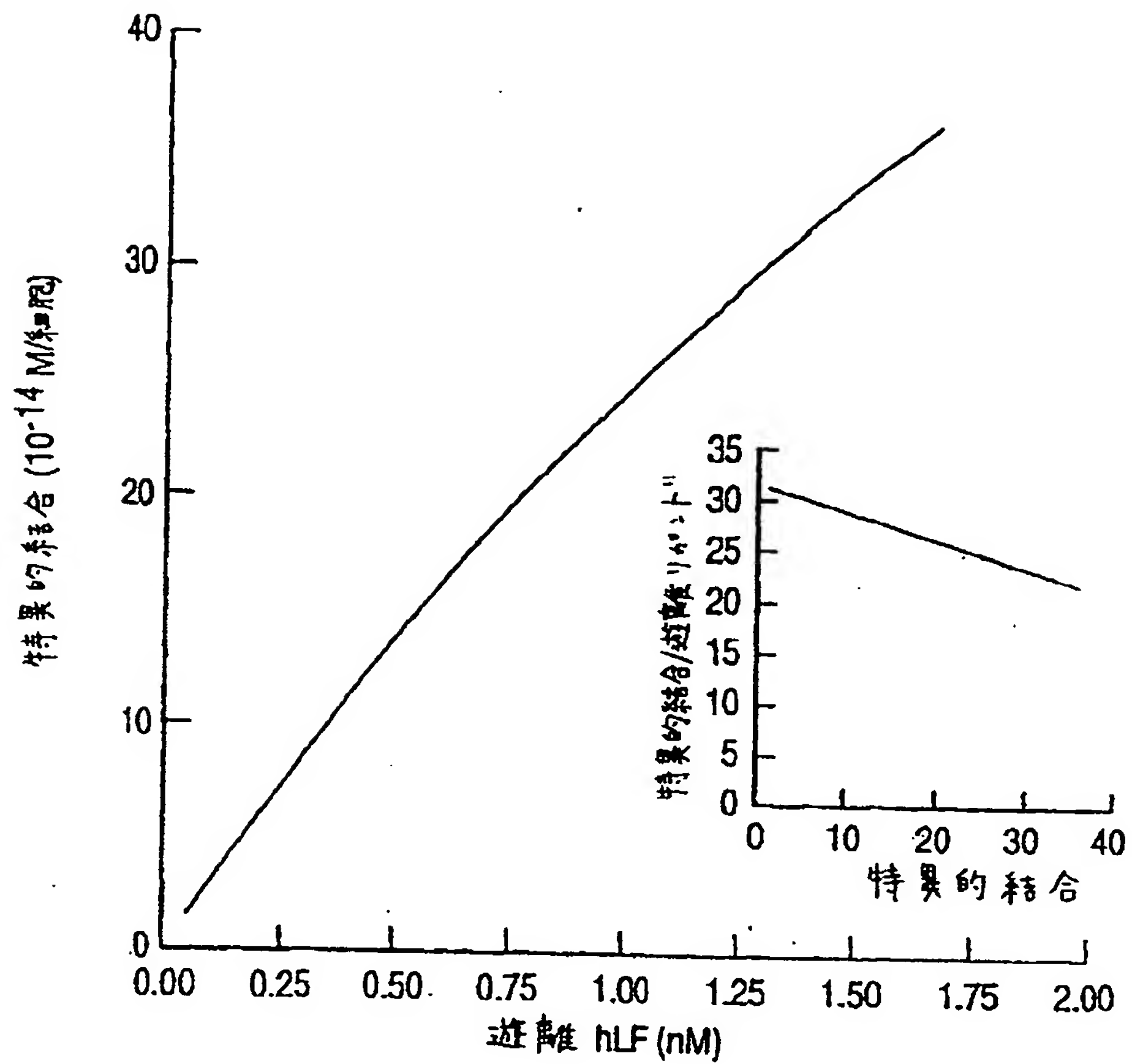


FIG. 17

【 図 1 8 】

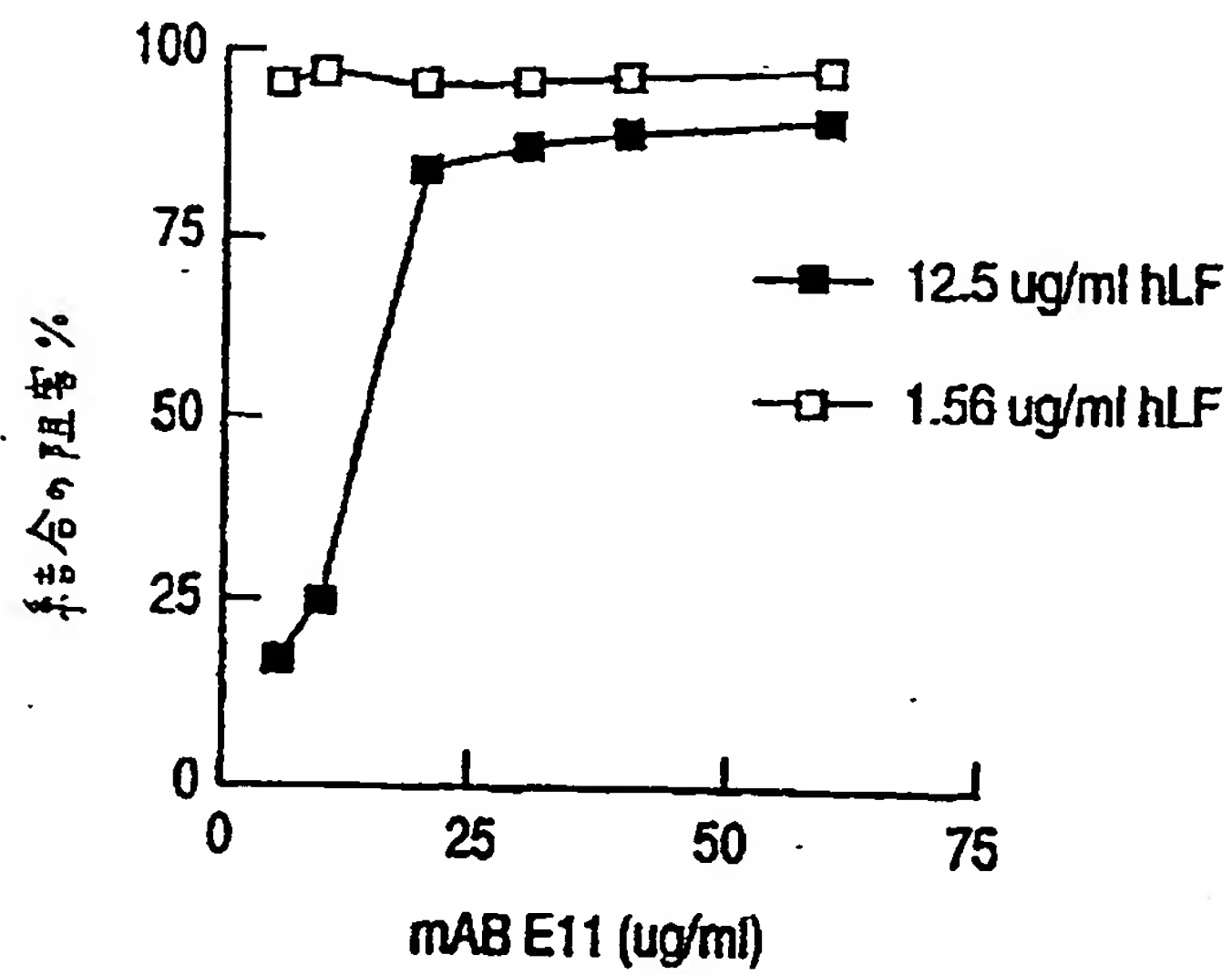


FIG. 18

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/IB 98/00441

## C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 584 558 A (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.) 2 March 1994 * page 2, lines 43-47; example 2; experimental examples; claim 4 *	36, 37
P, X	WO 97 45136 A (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE) 4 December 1997 * page 10, lines 8-14 *	2, 3
P, X	VAN BERKEL, P.H.C. ET AL.: "N-terminal stretch Arg2, Arg3, Arg4 and Arg5 of human lactoferrin ..." BIOCHEM. J., vol. 328, 15 November 1997, pages 145-151, XP002072084 * whole disclosure, esp. p. 146: "Isolation of N-terminally truncated natural hLF" *	2, 3
P, X	LEGRAND, D. ET AL.: "The N-terminal Arg2, Arg3 and Arg4 of human lactoferrin ..." BIOCHEM. J., vol. 327, 1 November 1997, pages 841-846, XP002072085 * abstract; tab. 2 *	2, 3

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	識別記号	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/12		A 6 1 P 31/18	
31/18		35/00	
35/00		37/06	
37/06		43/00	1 1 1
43/00	1 1 1	C 0 7 K 14/79	
C 0 7 K 14/79		C 1 2 N 7/04	
C 1 2 N 7/04		C 1 2 Q 1/02	
15/09	Z N A	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 Q 1/02		A 6 1 K 37/14	
// C 0 7 K 16/18		C 1 2 N 15/00	Z N A A
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, M W, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, E S, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, M G, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, V N, YU, ZW			

**THIS PAGE BLACK (USPTO)**



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**